ESPECIES DE « FUSARIUM »

QUE CAUSAN PODREDUMBRE EN LOS FRUTOS DE CAROZO (1)

Por CESAR J. M. CARRERA (2)

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser gibt einen kurzen historischen Ueberblick über das Studium der Wirkung verschiedener Species des Genus *Fusarium* auf Steinfrüchte. Er berichtet über seine Forschungsergebnisse mit infizierten Früchten und Aesten und stellt die Gegenwart von Diastasen fest. Die Arbeit enthält zwei Tabellen, die das Fortschreiten der durch Inokulation bewirkten Fäulnis erläutern.

En mi trabajo presentado a la Segunda Reunión de Ciencias Naturales, realizada en la ciudad de Mendoza durante el mes de abril del año 1937, en el capítulo donde trato la importancia de los *Fusarium sp.*, manifiesto que estos hongos son responsables de muchas enfermedades en los vegetales, como ser: marchitamientos varios, podredumbres radiculares de plantas industriales, podredumbres de raíces y tallos de cereales, tizón de plantas silvícolas, frutícolas y hortícolas, alteraciones cromógenas de maderas, podredumbres de frutos en general; por otra parte, al ocuparme de las lesiones que son capaces de producir los *Fusarium sp.*, menciono, al citar frutos carnosos, cinco especies causantes de podredumbres más bien secas para el duraznero, siendo ellas:

(1) Trabajo presentado en Reunión de Comunicaciones de la Sociedad Argentina de Ciencias Naturales, en marzo de 1939.

(2) Ingeniero agrónomo, Jefe de la División de Fitopatología del Ministerio de Agricultura de la Nación. Trabajo realizado en esa División.

Fusarium orthoceras App. et Wr. (Sinonimia: *F. asclerotium* (Sherb.) Wr.

Fusarium solani (Mart.) App. et Wr.

Fusarium avenaceum (Fr.) Sacc. (Sinonimia: *F. pirinum* (Fr.) Sacc. *F. putrefaciens* Ostw., *F. herbarum* Cda., etc.).

Fusarium poae (Peck.) Wr.

Fusarium lateritium Nees (Sinonimia: *F. lateritium* Nees v. *fructigenum* (Fr.) Wr., *F. pirinum* Sacc.

El objeto de esta publicación es dar cuenta de ciertas experiencias realizadas con los *Fusarium sp.* citados, a fin de determinar su actividad en la producción de podredumbre sobre frutos de carozo: durazno, ciruela, cereza y damascos, como también realizar la búsqueda tendiente a establecer de cuáles diastasas disponen durante su actividad metabólica; para nuestro país, la República Argentina, probablemente es novedad el todo de esta comunicación, pues no he tenido oportunidad de encontrar cita alguna. Descripciones sobre podredumbre en frutos, principalmente de carozo, fueron realizadas hace algunos años en Norte América y últimamente en Europa.

En forma sumaria haré conocer lo que se sabe al respecto hasta la fecha sobre podredumbre causadas por tales microorganismos.

El primer autor que descubrió y señaló una podredumbre en frutos debida a *Fusarium sp.*, fué A. Osterwalder en 1904 sobre manzanas, denominando al agente aislado *Fusarium putrefaciens* Ostw., hoy día conocido más propiamente bajo el nombre de *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. El mencionado autor realizó infecciones artificiales a través de heridas, obteniendo resultados positivos; negativas resultaron las infecciones artificiales colocando el hongo sobre la superficie del fruto intacto.

Posteriormente; Horne H. S. señala otros *Fusarium* para Gran Bretaña como causantes de podredumbres en frutos, muy principalmente sobre frutos de peral y manzanos; ellos fueron: *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. lateritium* Nees y *F. solani* (Mart.) App. et Wr.

Se debe a Plakidas A. G. el primer trabajo, publicado en 1925, sobre podredumbre debida a *Fusarium* en frutales de carozo. El citado autor determinó por primera vez en 1920 tal alteración

que le fuera dado observar sobre frutos de duraznero procedente de Mountain View California y estudios-investigaciones posteriores le permitieron determinar tres especies de *Fusarium*, es decir:

F. asclerotium (Sherb.) Wr. (hoy *F. orthoceras* App. et Wr.)

F. solani (Mart.) App. et Wr. y

F. pirinum Fries (hoy *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.).

Con cultivos puros monospóricos de estas especies, el autor realizó en laboratorio sobre frutos de duraznero naranjo-manzano y limonero, inoculaciones en cámaras húmedas con y sin producción de heridas, obteniendo en las diversas pruebas resultados positivos, principalmente en durazneros y naranjos. Demostró además que *Fusarium avenaceum* fué el más activo de las tres especies aisladas, requiriendo 20-30 días para producir la podredumbre total del fruto.

Infecciones artificiales a campo no le fué posible obtenerlas.

También realizó infecciones en ramitas de duraznero y damasco recién obtenidos y colocados bajo campana, atomizándolos con suspensiones de esporos, con resultado positivo, no siendo así en las pruebas a campo. Para estos casos, nuevamente *F. avenaceum* demostró ser más activo, siguiéndole *F. solani* y *F. orthoceras*.

En Italia, G. Goidanich durante el año 1934 describe dos especies de *Fusarium* (*F. herbarum* (Cda.) Fr. f. 1 Wr., hoy día *F. avenaceum*, y *Fusarium poae* (Peck.) Wr. como productores de podredumbre en frutos de duraznero.

El citado autor, después de describir los síntomas característicos de estas podredumbres, da cuenta de las infecciones artificiales realizadas empleando las dos especies de *Fusarium*, sea asociados como también, separados en ambiente húmedo y seco y sobre frutos más o menos maduros; en ciertos casos practicó heridas, en otros dejó la superficie intacta; realizó también inoculaciones internas con suspensión de esporos; los resultados obtenidos fueron:

1° Obtuvo resultados positivos inoculando *Fusarium sp.* en duraznos.

2° Ambas especies demostraron igual poder patógeno, demostrándose algo más activo *F. poae*.

3° El efecto de las dos especies asociadas fué idéntico al que se obtiene practicando las infecciones por separado.

4° Sobre frutos maduros la podredumbre es más rápida que sobre frutos no maduros.

5° La podredumbre es más rápida en ambiente húmedo que en seco;

6° La podredumbre se produce siempre que exista una lesión en la superficie del fruto; en caso contrario no se la obtiene.

7° Las inoculaciones en el interior del fruto mediante inyecciones con suspensión de esporos dieron resultados negativos.

8° Al cabo de 8 días en las condiciones experimentales la podredumbre se había completamente desarrollado.

Teniendo en cuenta los trabajos citados, es que me he propuesto realizar las experiencias correspondientes y comprobar la acción de ciertos *Fusarium sp.* como productores de podredumbres, inoculando en laboratorio y a campo, frutos y ramitas de durazneros, ciruelos, damascos y cerezos, llevándolas a cabo de la siguiente manera:

EXPERIMENTACIÓN

Inoculaciones en frutos. — Previa esterilización con bicloruro de mercurio al 1 °/₀₀, sumergiendo los frutos durante 30 minutos y lavado posterior en agua corriente también durante 30 minutos, se procedió a la inoculación por triplicado y testigo de cada uno de los *Fusarium sp.* en las especies frutales, duraznero, ciruelo, damascos y cerezos, practicando en ciertos casos heridas y en otros dejando la superficie intacta. El todo se colocó en cámaras húmedas y a temperaturas de ambiente oscilantes entre los 27-28° C.

Al mismo tiempo, por intermedio del laboratorio de Fitopatología instalado en José C. Paz, se practicaron las inoculaciones a campo.

Los resultados que se pueden observar en la planilla adjunta, demostraron que:

1° La podredumbre en frutos de duraznero, cerezo y damascos ocasionadas por *Fusarium sp.* pueden ser reproducidas arti-

ficialmente con facilidad; referente a frutos de ciruelo, esta alteración no progresa al interior de los mismos, manteniéndose la pulpa en general no desorganizada;

2° La infección del fruto fué siempre positiva cuando previamente se había lesionado su superficie; de lo contrario el resultado fué negativo.

3° Bajo las condiciones que se realizaron las experiencias, en frutos de duraznero se comenzaron a distinguir los primeros síntomas a las 40 horas de la inoculación, siendo bien visibles al 5° día. Para damascos y cerezos, después de las 48 horas se observa micelio eflorescente y en algunos casos, ciertos síntomas que se hacen bien visibles al octavo día.

Referente a ciruelos son observables síntomas que hacen suponer desde el primer momento podredumbre, no siendo así más tarde, pues parece que el ataque es detenido y la pulpa se mantiene dura como en el testigo, salvo eflorescencia micelial apenas visible en lugar de la infección.

El cuadro de la página siguiente dará una idea de los resultados obtenidos.

Infecciones en ramitas. — Habiendo tenido oportunidad de observar sobre muestras de ramitas de duraznero y posteriormente en plantas de la misma especie frutal de la localidad de Luján, F. C. O., las cuales presentaban un ataque combinado de « Viruela de la púa » (*Phoma persicae* Sacc.) y *Fusarium lateritium,* que se ponía en evidencia por las fructificaciones, esporodoquios color rojo anaranjado, procedí al aislamiento del *Fusarium* citado y luego de obtenerlo en cultivo puro, realizar las infecciones artificiales (suspensión de esporos) en ramitas, principalmente en la región de las yemas, mediante atomizaciones y difusión de micelio en diversas especies frutales (ciruelo-damasco-cerezo y duraznero), no habiéndose obtenido resultados positivos.

Determinación de diastasas o enzimas

Para cada una de las especies en estudio me he propuesto conocer las diastasas o enzimas que éstas son capaces de disponer, para lo cual traté de establecer la presencia de:

	Durazno		Ciruela	
	40 horas	5 días	48 horas	8 días
Fusarium solani.....	Muy poca podredumbre	Podredumbre 4 cm. ±, color rojo vinoso, púrpura violáceo	Ligero ataque, coloración obscura en la región de infección	Infección reducida, ataque no prospera, reducido al punto de infección, deprimido 12-13 mm. de diámetro, pulpa dura, micelio aéreo laxo extendido por la superficie
Fusarium avenaceum....	Poca podredumbre	Poca podredumbre, no avanza, micelio aéreo color blanco en el lugar de la infección	No es observable ataque	Infecciones ulteriores, impidieron efectuar la observación
Fusarium orthoceras....	Bastante podredumbre	Podredumbre variable de 2 ½ a 4 cm., color Dresden brown-Mummy brown	Depresión en lugar de la infección sin notarse la podredumbre	Ataque estacionario manteniéndose como a las 48 horas, micelio aéreo aracnoide, pulpa dura
Fusarium poae.	Poca a bastante podredumbre	Poca podredumbre, color rojo vinoso, púrpura con micelio aéreo blanco abundante	Poco ataque, poco visible, micelio aéreo	Ataque no prospera, micelio aéreo pobre, aracnoideo, pulpa dura
Fusarium lateritium.....	Poca podredumbre	Podredumbre 1 ½ 2 cm. color Dresden brown, mancha deprimida	No es visible podredumbre, micelio aéreo en el lugar de la infección	Depresión del lugar infectado 6 a 10 mm. pulpa dura ; micelio aéreo 6-10 mm. blanco laxo
Testigo.....	Ningún sínt.	Ningún síntoma	Ningún síntoma	Ningún síntoma

Damasco		Cereza	
48 horas	8 días	48 horas	8 días
Ataque no bien visible	Fruto podrido, recubierto de micelio algodonoso algo laxo, blanco, ligeramente cremoso, pulpa blanda	Depresión en el lugar infectado, diámetro de 6 a 7 mm.	Fruto podrido, ídem a damasco, pulpa blanda
No bien visible el ataque	Infecciones ulteriores impidieron efectuar la observación	No bien visible ataque, micelio aéreo en lugar de la infección	Infecciones ulteriores, impidieron efectuar la observación
Ligera coloración obscura alrededor de punto de infección	Podredumbre total del fruto, lugar infección deprimido, aspecto mantecoso alrededor, micelio laxo, blanco	No bien visible aún la podredumbre, micelio aéreo en el punto de infección.	Podredumbre en la mitad del fruto, micelio aéreo blanco algodonoso
Muy poco ataque, micelio aéreo	Podredumbre total del fruto, bastante micelio aéreo blanco algodonoso, lo mismo que en cerezo	Muy poco ataque, algo más que en los otros frutos, micelio aéreo en el punto de infección	Hay podredumbre del fruto total, micelio aéreo 13-14 mm. diám. blanco algodonoso, sobre elevado centro, aspecto ceroso
No es visible podredumbre, micelio aéreo en lugar de infección	Nótase podredumbre abarcando parcialmente al fruto, micelio aéreo	No es visible podredumbre, micelio aéreo en lugar de infección	Podredumbre total del fruto con ablandamiento, poco micelio aéreo
Ningún síntoma	Ningún síntoma	Ningún síntoma	Ningún síntoma

Diastasas o enzimas oxidantes : oxidasas, peroxidasas y tirosinasa.

Diastasas o enzimas hidrolizantes : amilasa, pectinasa, proteasa, lipasa y emulsina.

Empleando los métodos indicados por Rouge E. y adoptados por R. Gigante en un trabajo sobre morfología, biología y posición sistemática del hongo que se describió como *Macrophoma dalmática.*

Para estas experiencias utilicé el substracto natural líquido de zanahoria (caldo de zanahoria) sobre el cual se había desarrollado el hongo como mínimo 15 días. El líquido obtenido después de la filtración sirvió para las determinaciones que se detallan a continuación:

Oxidasas : A una solución alcohólica 1% de Resina de Guayaco se le agregó un poco de líquido cultural del hongo; la reacción no fué positiva en ningún caso, puesto que no se observó la coloración característica azul.

Peroxidasas : Lo mismo que en el caso anterior, pero con el agregado de agua oxigenada (H_2O_2), se obtuvo coloración azul para las especies *F. orthoceras* y *F. solani,* siendo más intensa para esta última. Queda pues demostrada la producción de peroxidasas en los *Fusarium sp.* citados, no siendo así para los demás.

Tirosinasa : A una solución de tirosina 1‰ en agua destilada se le agregó el líquido cultural del hongo. En presencia de esta diastasa el líquido debió dar coloración final obscura por oxidación de la tirosina, cosa que no se obtuvo para todas las especies demostrando la no presencia de tirosinasa.

Amilasa (Método Pottevin): Se prepara una solución acuosa 1% de almidón soluble, colocándola previamente y durante 30 minutos a 90° C. de temperatura y luego 20 minutos a 120° C. Posteriormente en tubos de ensayo se colocaron 5 cc. de la solución almidón soluble más 1 cc. de líquido cultural del hongo; los tubos testigos contenían únicamente la solución almidón soluble, colocándose luego el todo a 60° C. de temperatura durante 5 horas, procediéndose una vez vencido el plazo, a la prueba con solución Lugol (solución yodoyodurada).

En los tubos donde se había agregado líquido cultural de *F.*

solani, F. avenaceum y *F. orthoceras,* se obtuvo coloración azul, idéntica a los testigos, característica por la falta de amilasa.

Pectinasa : Fué determinada su presencia de la siguiente manera : Se colocó en vasos Erlenmeyer cierta cantidad de líquido cultural del hongo, hecho lo cual se colocaron en ellos pedazos de zanahoria y gotas de Toluol para evitar el desarrollo de hongos y bacterias. Por otra parte y en calidad de testigo, el líquido cultural previamente alcoholado, de los pedazos de zanahoria, se le mantuvo durante 30 minutos a 98° C. a fin de inactivar la diastasa que estuviera presente. El todo se colocó a temperatura de 25° C. aproximadamente durante 3 días, después de los cuales se procedió al análisis obteniéndose el siguiente resultado :

Testigos : No se comprueba ningún ablandamiento, permaneciendo los trozos de zanahoria bien consistentes.

En los medios pertenecientes a *F. solani, F. avenaceum* y *F. orthoceras,* los trozos de zanahoria presentaban una consistencia blanda fácilmente disgregables a la presión de los dedos.

La observación macroscópica demostró la desaparición de la lámina media de pectina mediante la reacción del Azul de prusia negativa.

Queda con esto demostrada la producción de pectinasa en los *Fusarium sp.* citados.

Proteasa : Para la determinación de esta enzima se procedió al cultivo de los hongos en tubos de ensayo, conteniendo medio de cultivo (caldo zanahoria o caldo papa) solidificado con gelatina de pescado.

Después de 80 días se comprobó que todos los *Fusarium sp.* licuaban la gelatina en mayor o menor grado y en una profundidad no menos de 25 mm.

Emulsina : Aprovechando la acción que tiene la emulsina sobre la amigdalina descomponiendo a ésta en aldehida benzoica y ácido cianhídrico y glucosa, es que se utilizó tal reacción para determinar esta diastasa.

A una solución acuosa de amigdalina al 1 % colocada en tubos de ensayo en cantidad de 5 cc., se le agregó 1 cc. del substracto nutritivo del hongo ; tubos testigos contenían solamente la solución de amigdalina.

El olor característico de aldehida benzoica puso en evidencia la diastasa emulsina producida por *F. poae* y *F. orthoceras*, comportándose las demás especies como los testigos.

Lipasa (indicaciones de Eyre 1931): Se prepararon recipientes conteniendo cantidades iguales de líquido cultural del hongo y una solución del 1% de monobutirina en agua destilada. Una parte de estos recipientes fueron tenidos a temperatura de 98° C. durante 30 minutos como testigo y el todo se colocó a temperatura de 25-30° C. más o menos, agregándose gotas de Toluol a fin de evitar el desarrollo de hongos y bacterias.

El aumento de acidez al tercer día, comprobado con el procedimiento de la fenolftaleína, demostró que para neutralizar la acidez final producida por la hidrólisis de la monobutirina en ácido butírico en presencia de lipasa se necesitaron cinco veces más NaOH N/10 de lo necesitado al principio; para el caso de *F. solani*, muestra que para *F. lateritium* sólo se necesita una cantidad tres veces más. En los demás casos no hubo cambio de reacción, por lo que se descartó la presencia de lipasa.

Invertasa (método Effront): A 10 cc. de solución acuosa 10% de sacarosa se le agregó 1 cc. del líquido cultural del hongo, permaneciendo los testigos sin agregado.

Los recipientes fueron colocados primero durante 30 minutos a 50° C., llevándose luego a 98° C. durante 5 minutos, previo agregado del 1 cc. de solución normal NaOH. No habiéndose obtenido coloración obscura, signo de la inversión de la sacarosa, pone en evidencia que no hubo presencia de la citada diastasa.

De acuerdo a las determinaciones realizadas se llegó a la conclusión que:

Fusarium poae tiene la propiedad de formar las siguientes diastasas: Emulsina y Proteasa.

Fusarium solani tiene la propiedad de formar las siguientes diastasas: Amilasa, Peroxidasas, Pectinasa, Lipasa y Proteasa.

Fusarium avenaceum tiene la propiedad de formar las siguientes diastasas: Amilasa, Pectinasa y Proteasa.

Fusarium orthoceras tiene la propiedad de formar las siguientes diastasas: Peroxidasas, Amilasa, Pectinasa, Emulsina y Proteasa.

Fusarium lateritium tiene la propiedad de formar las siguientes diastasas: Lipasa y Proteasa.

El cuadro a continuación dará un resumen de la producción de enzimas por parte de los diversos *Fusarium sp.* en estudio:

Enzimas	Testigo	*Fusarium poae*	*Fusarium solani*	*Fusarium avenaceum*	*Fusarium orthoceras*	*Fusarium lateritium*
Oxidasa	—	—	—	—	—	—
Peroxidasa ...	—	—	+	—	+++	—
Tirosinasa ...	—	—	—	—	—	—
Amilasa	—	—	+	+	+++	—
Pectinasa	—	—	+	+	+	—
Emulsina	—	++	—	—	+	—
Lipasa	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{3}$
Invertasa	—	—	—	—	—	—
Proteasa (a los 80 días)....	—	35 mm.	29 mm.	25 mm.	32 mm.	27 mm.

— Sin reacción.
\+ Reacción levemente positiva.
++ Reacción positiva, algo más que en +.
+++ Reacción francamente positiva.
1 — $\frac{1}{5}$, etc. El número superior indica la acidez al comienzo de la experiencia y el inferior, el de la acidez al terminar la misma.

Después de lo expuesto precedentemente, me cabe tratar en forma sumaria sobre la importancia económica que tienen las podredumbres ocasionadas por *Fusarium sp.* en general; de la bibliografía consultada se deduce que los daños ocasionados en ciertos casos y para determinadas variedades oscilan entre el 5 y 10%, pero con todo esto, los autores están concordes que éstos no deben calcularse de gravedad. Los perjuicios se producen sobre todo en frutos maduros, muy principalmente en aquellos que por estar lesionados abren una puerta de entrada a estos organismos que serían considerados como simples saprófitos de heridas, los cuales bajo condiciones favorables pueden actuar como parásitos; lo mismo podría decirse para los ataques en ramitas.

El procedimiento de lucha contra esta enfermedad es fácil;

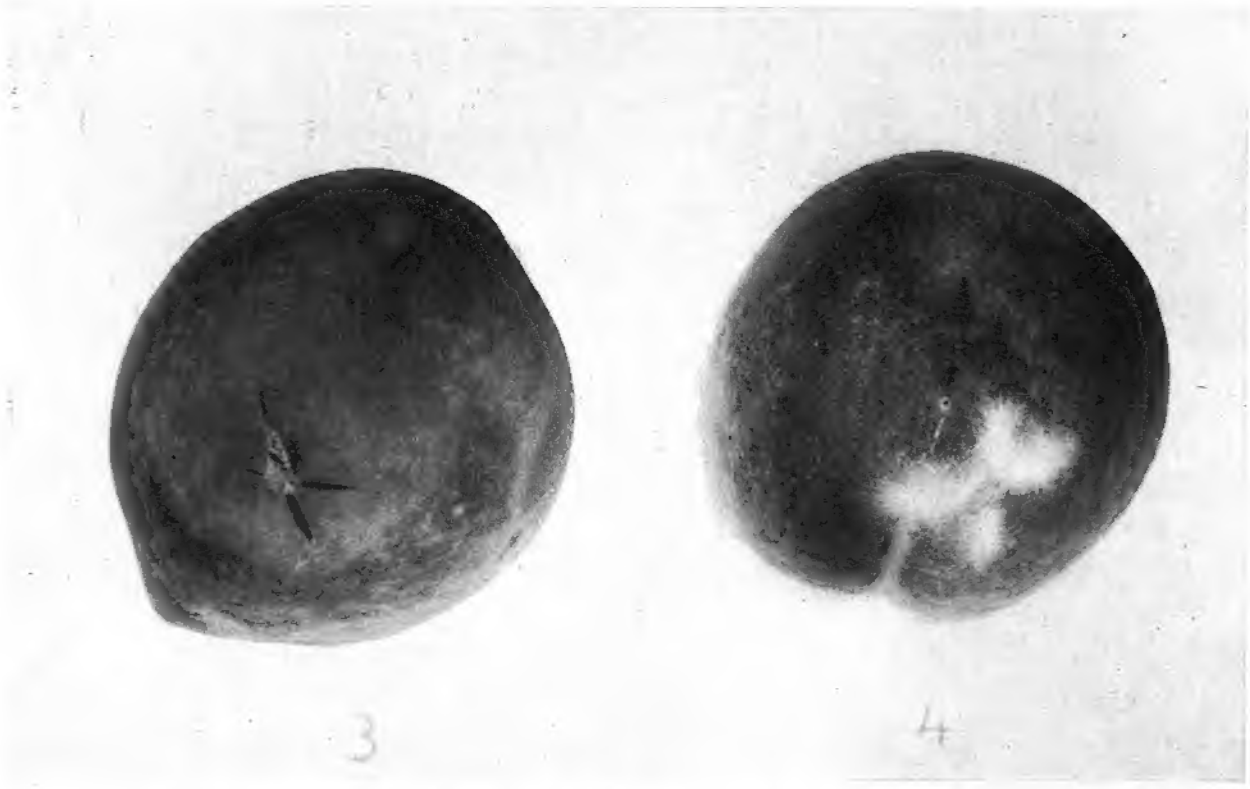
sería suficiente separar todo fruto que presente algún síntoma y proceder a su inmediata destrucción; por otra parte, sería conveniente evitar el embalaje de frutos que presenten ataque de Laspeyresia, los completamente maduros, como también vigilar el manipuleo de los mismos, a fin de que no se les trate con brusquedad para evitar lesiones, heridas, etc., dentro de las cuales podrían prosperar estos microorganismos.

Por otra parte, deberá cuidarse en absoluto la mezcla de frutos alterados con los sanos, puesto que ellos podrían difundir la podredumbre a toda la caja y se observa esto, por el hecho que experimentalmente Goidanich demostró la posibilidad de provocar la infección mediante la colocación sobre la superficie intacta del fruto, un trozo de micelio nutritivo sobre el cual se desarrollaba el hongo. Explica el citado autor este hecho por un aumento de la virulencia del *Fusarium* gracias a substancias nutritivas de la cual puede disponer, lo que le permitiría penetrar a través de la epidermis sana.

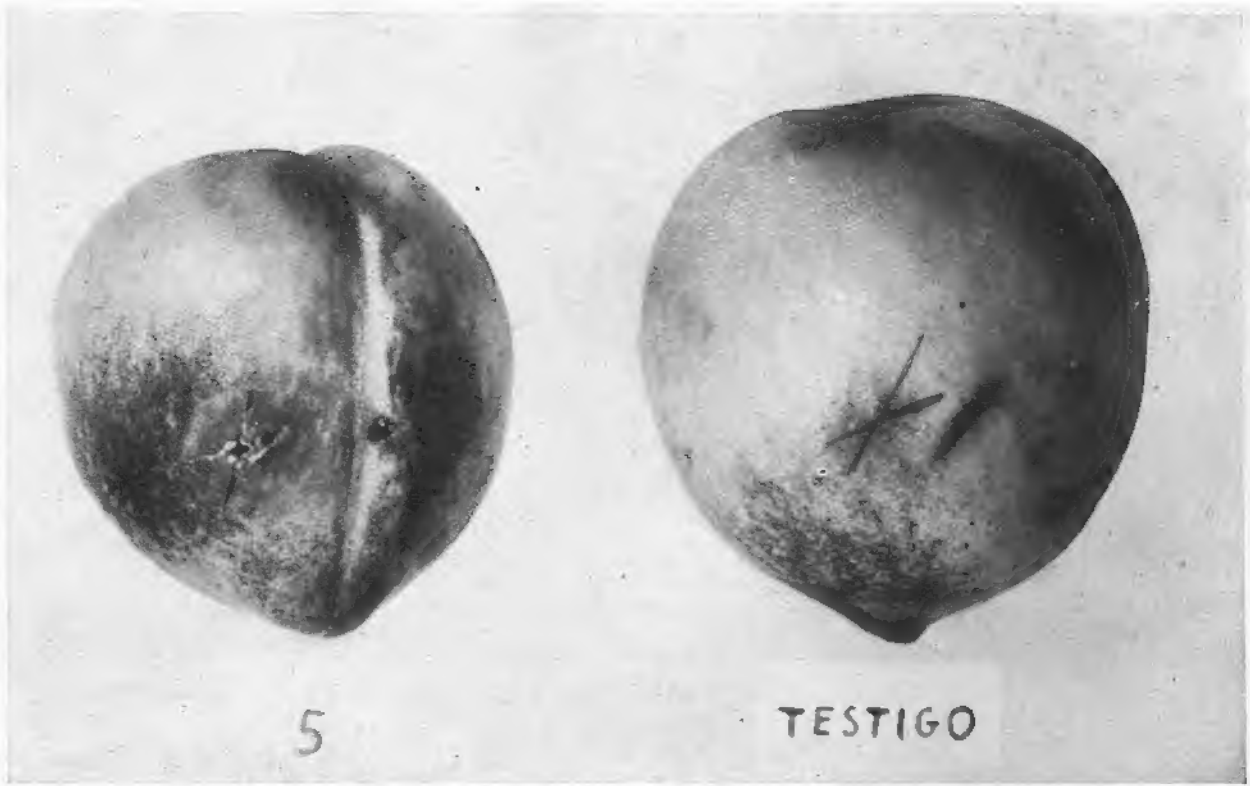
BIBLIOGRAFÍA

1. Carrera, C., *El género Fusarium en la R. Argentina, estudio e identificación de algunas especies*, en *II Reunión de Ciencias Naturales*, Mendoza, abril de 1937, *Physis*, **15** (47), págs. 21-77; 1939.
2. Coons, H. G. 1927. *Some aspect of the Fusarium problem*. Lectura dada en el State Univ. Iowa City, febrero 23 de 1927; Univ. of Minnessota, Minneapolis, febrero 24 y The Mayo Foundation Rochester, febrero 25.
3. Goidanich, G. 1934. *Un marciume delle pesche causato da due specie di Fusarium (F. herbarum* (Cda.) *f. 1* Wr. y *F. poae* (Peck.) Wr., in *Boll. d. R. Staz. di Pat. Vegetale*, 24 N. S.; nº 5: 475-491.
4. Plakidas, A. J. 1925. *Fusarium rot of the peach*, in *Phytopathology*, págs. 92-98.
5. Wollenweber, H. W. y Reinking, O. A. 1935. *Die Fusarien*, en *Verlag Paul Parey*, Berlín, págs. 1-355.
6. Roberts, J. W. 1923. *A bud rot of the peach caused by a species of Fusarium*, en *Journ. Agr. Res.* **26**, págs. 507-511.

1, Durazno infectado con *Fusarium solani* (5 días); 2, Durazno infectado con *Fusarium arenaceum* (5 días)



3. Durazno infectado con *Fusarium orthoceras* (5 días); 4. Durazno infectado con *Fusarium poae* (5 días)



5, Durazno infectado con *Fusarium lateritium* (5 días); 6, Testigo